

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58>

# Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей

А.В. Пономарев, А.А. Рудакова, З.А. Соколова, М.А. Барышникова, В.С. Косоруков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Александр Васильевич Пономарев [kl8546@yandex.ru](mailto:kl8546@yandex.ru)

**Введение.** Известно, что агонист TLR-3 Poly(I:C), используемый в качестве адъюванта в ряде моделей противоопухолевых вакцин, вызывает торможение роста меланомы B16, однако недостаточно полно изучены иммунологические аспекты, вовлеченные в этот процесс.

**Цель исследования** – оценка изменений иммунофенотипа клеток селезенки мышей C57BL/6, вызванных опухолевой нагрузкой и/или Poly(I:C), для лучшего понимания процессов, происходящих при торможении роста меланомы B16-F10 под воздействием Poly(I:C).

**Материалы и методы.** С помощью проточной цитометрии исследовали иммунофенотип спленоцитов мышей C57BL/6: 1-я группа – контроль (интактные животные), 2-я группа – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, 3-я группа – мыши без опухоли, получавшие Poly(I:C), и 4-я группа – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, получавшие Poly(I:C).

**Результаты.** Медианы значений таких параметров, как иммунорегуляторный индекс CD4/CD8, количество CD69<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, количество В- и NK-клеток для группы мышей с меланомой, получавших Poly(I:C), находятся между значениями указанных параметров в контрольной группе и в группе мышей с B16-F10. При сравнении показателей количество В- и NK-клеток, количество CD69<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, их медианы в группе мышей с меланомой, получавших Poly(I:C), оказались ближе к контролю, чем к значениям, полученным в группе B16-F10 и в группе здоровых мышей, получивших Poly(I:C). В то же время нами обнаружено, что общее количество CD3<sup>+</sup>-клеток, количество наивных Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> выше в группе мышей с меланомой, получавших Poly(I:C), по сравнению со всеми остальными группами.

**Заключение.** Выявлены параметры иммунофенотипа клеток селезенки мышей (CD4/CD8, количество CD69<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, количество В- и NK-клеток), на которые влияют опухолевая нагрузка и/или введение адъюванта Poly(I:C). Изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей связаны с наличием опухоли и ее размерами. Также обнаружено, что на иммунофенотип спленоцитов оказывает влияние многократное введение Poly(I:C) во время роста опухоли.

**Ключевые слова:** Poly(I:C), иммунофенотипирование, клетки селезенки, меланома B16-F10

**Для цитирования:** Пономарев А.В., Рудакова А.А., Соколова З.А. и др. Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):51–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58.

## Effect of Poly(I:C) and melanoma B16-F10 on the immunophenotype of murine spleen cells

Aleksandr V. Ponomarev, Anna A. Rudakova, Zinaida A. Sokolova, Maria A. Baryshnikova, Vyacheslav S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Contacts:** Aleksandr Vasilyevich Ponomarev [kl8546@yandex.ru](mailto:kl8546@yandex.ru)

**Introduction.** It is known that the agonist of TLR-3 Poly(I:C), used as an adjuvant in a number of models of antitumor vaccines, causes inhibition of melanoma B16 growth, but the immunological aspects involved in this process have not been fully studied.

**The aim of the study** was to evaluate changes of the immunophenotype of the spleen cells of C57BL/6 mice caused by the tumor load and/or Poly(I:C), which is necessary for better understanding of the processes occurring during Poly(I:C) inhibition of melanoma B16-F10.

**Materials and methods.** The immunophenotype of splenocytes of C57BL/6 mice was studied by flow cytometry as follows: the group 1 was a control (intact animals), the group 2 was mice with subcutaneously transplanted melanoma B16-F10, the group 3 was mice without a tumor treated with Poly(I:C) and the group 4 – mice with subcutaneously transplanted melanoma B16-F10 treated with Poly(I:C).

**Results.** Median values of parameters such as the CD4/CD8 immunoregulatory index, the percentage of CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, the number of B and NK cells for the group of mice with melanoma treated with Poly(I:C) were between the values in the control group and in the group of mice with B16-F10. When comparing the results, the number of B and NK cells, the percentage of CD69<sup>+</sup> on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, their median in the group of mice with melanoma treated with Poly(I:C) was closer to the control than to the values obtained in the B16-F10 group and in the group of healthy mice receiving Poly(I:C). At the same time, we found that the total number of CD3<sup>+</sup> cells, the number of naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was higher in the group of mice with melanoma treated with Poly(I:C) compared to all other groups.

**Conclusion.** The analysis revealed the changes of the immunophenotype of murine spleen cells (CD4/CD8, the percentage of CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, the number of B and NK cells), which were affected by the tumor load and/or the administration of Poly adjuvant (I:C). Changes in the immunophenotype of murine splenocytes were associated with the tumor load and its size. It was also found that the splenocyte immunophenotype was affected by the repeated administration of Poly(I:C) during the tumor growth.

**Key words:** Poly(I:C), immunophenotyping, spleen cells, melanoma B16-F10

**For citation:** Ponomarev A.V., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Effect of Poly(I:C) and melanoma B16-F10 on the immunophenotype of murine spleen cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):51–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58.

## Введение

Применение терапевтических противоопухолевых вакцин — один из перспективных подходов к лечению злокачественных новообразований, который использует иммунную систему для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Важными компонентами, обеспечивающими эффективность противоопухолевых вакцин, являются адъюванты, которые усиливают иммуногенность вакцинных антигенов за счет стимуляции врожденного иммунного ответа, что приводит к развитию адаптивного иммунного ответа против опухоли. Одним из таких адъювантов является Poly(I:C) — полирибоинозин-полирибонитидиловая кислота (polyriboinosinic-polyribocytidylic acid), синтетический имитатор полимеров вирусной двуцепочечной РНК.

В литературе достаточно подробно описан феномен торможения роста меланомы мышей B16 под воздействием Poly(I:C) [1, 2]. Данное явление было отмечено и в нашем исследовании противоопухолевой эффективности модели противомеланомной неантигенной вакцины [3]. Известно, что на опухолевых клетках меланомы B16 слабо экспрессируется молекула МНС класса I [4], поэтому вклад Т-клеток в замедление роста опухоли под влиянием Poly(I:C) не очень существенный [1]. В то же время значителен вклад NK-клеток. Это связано как с цитотоксической активностью NK-клеток [1], так и с выработкой NK-клетками интерферона  $\gamma$ , который оказался способен напрямую ингибировать пролиферацию клеток меланомы B16 [2]. Чтобы лучше понимать иммунные процессы, происходящие при феномене торможения роста меланомы B16 под воздействием Poly(I:C), мы

изучили изменения иммунофенотипа клеток селезенки мышей.

**Цель исследования** — оценка изменений иммунофенотипа селезенки мышей C57BL/6, вызванных опухолевой нагрузкой и/или Poly(I:C), для лучшего понимания процессов, происходящих при торможении роста меланомы B16-F10 под воздействием Poly(I:C).

В работе оценивали такие иммунологические параметры, как количество CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток и отношение CD4/CD8 (иммунорегуляторный индекс) [5]. Также оценивали состояние дифференцировки CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, которое определяется экспрессией CD44 и CD62L. Наивные CD8<sup>+</sup>-Т-клетки (Tn) имеют фенотип CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. После инфицирования или иммунизации на антиген-активированных CD8<sup>+</sup>-Т-клетках повышается экспрессия CD44 и теряется CD62L, такие клетки становятся эффекторными Т-клетками (Teff). После разрешения инфекции популяция клеток CD8-Teff сокращается и начинают формироваться популяции клеток памяти. CD8<sup>+</sup>-Т-клетки часто определяют как Т-клетки центральной памяти (Tcm) CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и Т-клетки эффекторной памяти (Tem) CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Для CD4<sup>+</sup>-Т-клеток состояние дифференцировки определяется схожим образом, но с помощью проточной цитометрии отчетливо выделяются только 2 популяции — это Tn и Tem [6]. CD69 — ранний маркер активации лимфоцитов из-за его быстрого появления на поверхности плазматической мембраны после стимуляции [7]. В литературе отмечено, что CD69 связан с ингибированием противоопухолевого иммунного надзора [8]. Возможно, вклад в этот процесс

также вносит экспрессия CD69 на CD4<sup>+</sup>-Т-клетках, обладающих регуляторными функциями [9]. NKp46 (CD335) принадлежит к семейству рецепторов естественной цитотоксичности. Его экспрессия ограничена NK-клетками и субпопуляцией NKT-клеток. NKp46 считается одним из маркеров NK-клеток мыши [10]. CD19 — член суперсемейства иммуноглобулинов. Он экспрессируется на предшественниках и зрелых В-клетках, является маркером В-клеток у мышей. Плазматические клетки не экспрессируют CD19. CD3 является маркером Т-клеток [6].

### Материалы и методы

В исследовании использовали мышей-самцов C57BL/6 одного возраста массой 20–22 г, полученных из экспериментально-биологической лаборатории (вивария) ФГБУ «Национальный исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных разделили на 4 группы:

- 1-я группа (контроль) — интактные мыши ( $n = 6$ );
- 2-я группа — мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10 ( $n = 5$ );
- 3-я группа — мыши без опухоли, которые получали Poly(I:C) (Sigma) подкожно в дозе 50 мкг в 300 мкл физиологического раствора 6-кратно с интервалом 3 сут ( $n = 5$ );
- 4-я группа — мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, которые получали Poly(I:C) (Sigma) подкожно в дозе 50 мкг в 300 мкл физиологического раствора 6-кратно с интервалом 3 сут; 1-е введение Poly (I:C) было на 1-е сутки после перевивки опухоли ( $n = 6$ ).

Мышам во 2-й и 4-й группах перевивали меланому B16-F10 подкожно по 75 тыс. клеток/мышь.

Через 19 дней после начала эксперимента мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и забирали у них селезенку. Спленоциты осторожно выделяли из стромы органа с помощью отдельного стерильного стеклянного гомогенизатора, клеточную суспензию фильтровали через 8 слоев марли и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 7 мин в фосфатно-солевом буфере, после чего еще раз фильтровали через стерильный одноразовый фильтр для очистки клеточной суспензии (Filcons, BD Biosciences) и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. В полученной клеточной суспензии проводили гипотонический лизис эритроцитов, окрашивали клетки красителем жизнеспособности Fixable Viability Stain 510 (FVS510) (BD Biosciences) в соответствии с рекомендациями производителя, затем клетки отмывали и окрашивали антителами (табл. 1), инкубировали 30 мин в темноте, после чего отмывали в фосфатно-солевом буфере. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™

(Becton Dickinson). Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию FVS510. Процент исследуемых клеток высчитывали от всех живых CD45<sup>+</sup>-клеток селезенки. Стратегия гейтирования представлена на рис. 1, 2.

Таблица 1. Антитела, применяемые в работе

Table 1. Antibodies used in the work

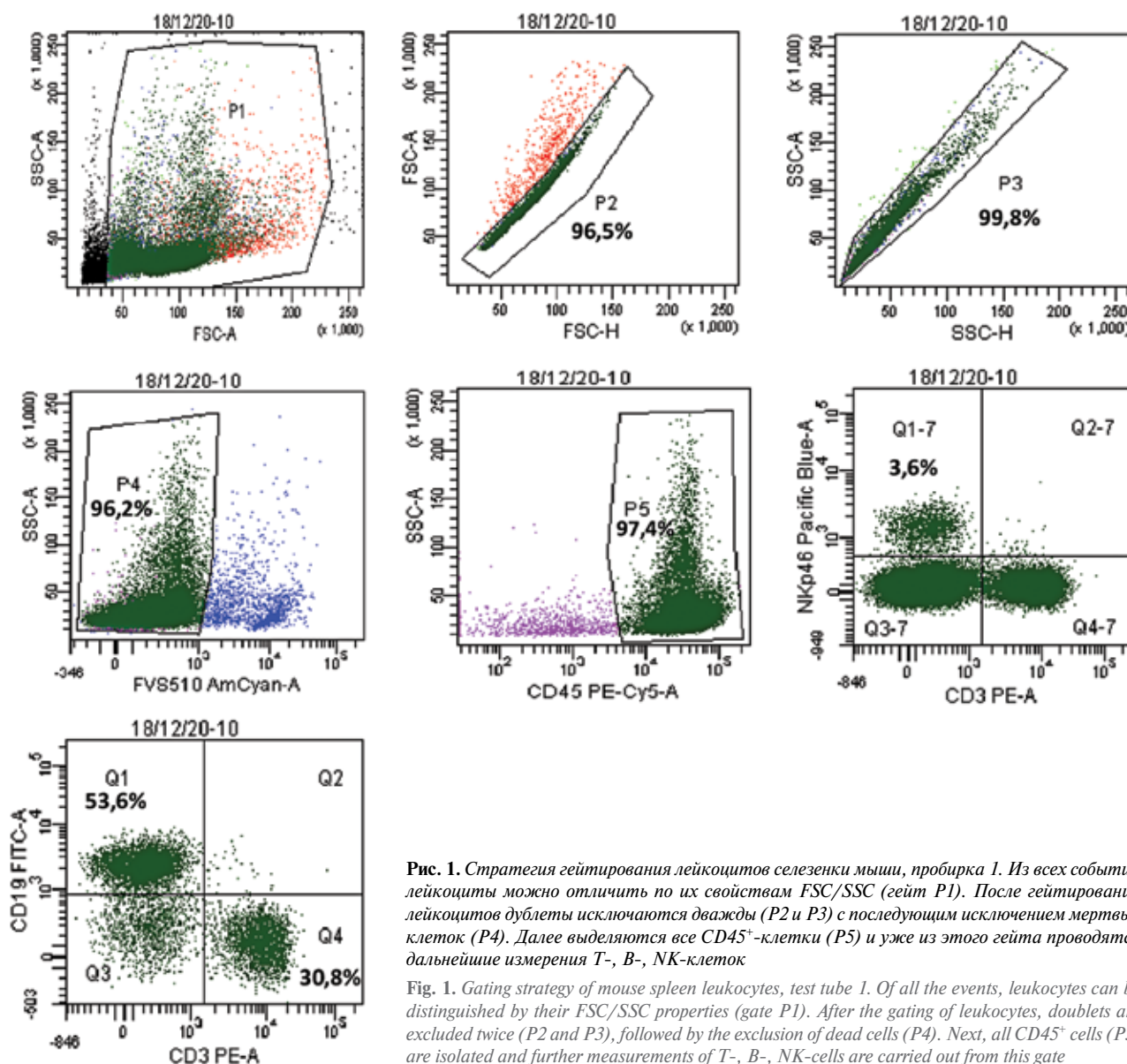
| Название<br>Name | Краситель<br>Dye | Клон<br>Clone | Производитель<br>Manufacturer |
|------------------|------------------|---------------|-------------------------------|
| NKp46<br>(CD335) | eFluor450        | 29A1.4        | eBioscience                   |
| CD62L            | eFluor450        | MEL-14        | eBioscience                   |
| CD45             | PerCP-Cy5.5      | 30-F11        | Biolegend                     |
| CD4              | PE-Cy7           | GK1.5         | Biolegend                     |
| CD44             | APC-Cy7          | IM7           | Biolegend                     |
| CD8              | PE               | 53-6.7        | Biolegend                     |
| CD8              | FITC             | 53-6.7        | Biolegend                     |
| CD69             | PE               | H1.2F3        | Biolegend                     |
| CD19             | FITC             | 6D5           | Biolegend                     |
| CD3              | PE               | 17A2          | Biolegend                     |
| CD3              | APC              | 17A2          | Biolegend                     |

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью программы Statistica 2.0 с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В табл. 2 представлены результаты иммунофенотипирования спленоцитов мышей C57BL/6.

При сравнении иммунофенотипа спленоцитов мышей 1-й (контрольной) группы и 2-й группы (с опухолью) обнаружен ряд отличий. Количество CD4<sup>+</sup>-Т-клеток значимо снижено во 2-й группе, при этом также понижен иммунорегуляторный индекс, что встречается при хронической антигенной стимуляции [5], но различие не является статистически значимым. Нами отмечено значимое повышение субпопуляции CD69-положительных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток во 2-й группе по сравнению с контролем. В литературе имеются данные о повышении количества CD69-положительных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток у мышей с опухолью B16 и отмечается, что это связано с иммуносупрессией [9]. Во 2-й группе нами отмечено значимое снижение количества наивных CD44<sup>+</sup>-CD62L<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> по сравнению с контролем, что также может свидетельствовать о хронической антигенной стимуляции. Кроме того,



**Рис. 1.** Стратегия гейтирования лейкоцитов селезенки мыши, пробирка 1. Из всех событий лейкоциты можно отличить по их свойствам FSC/SSC (гейт P1). После гейтирования лейкоцитов дублиеты исключаются дважды (P2 и P3) с последующим исключением мертвых клеток (P4). Далее выделяются все CD45<sup>+</sup>-клетки (P5) и уже из этого гейта проводятся дальнейшие измерения T<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, NK-клеток

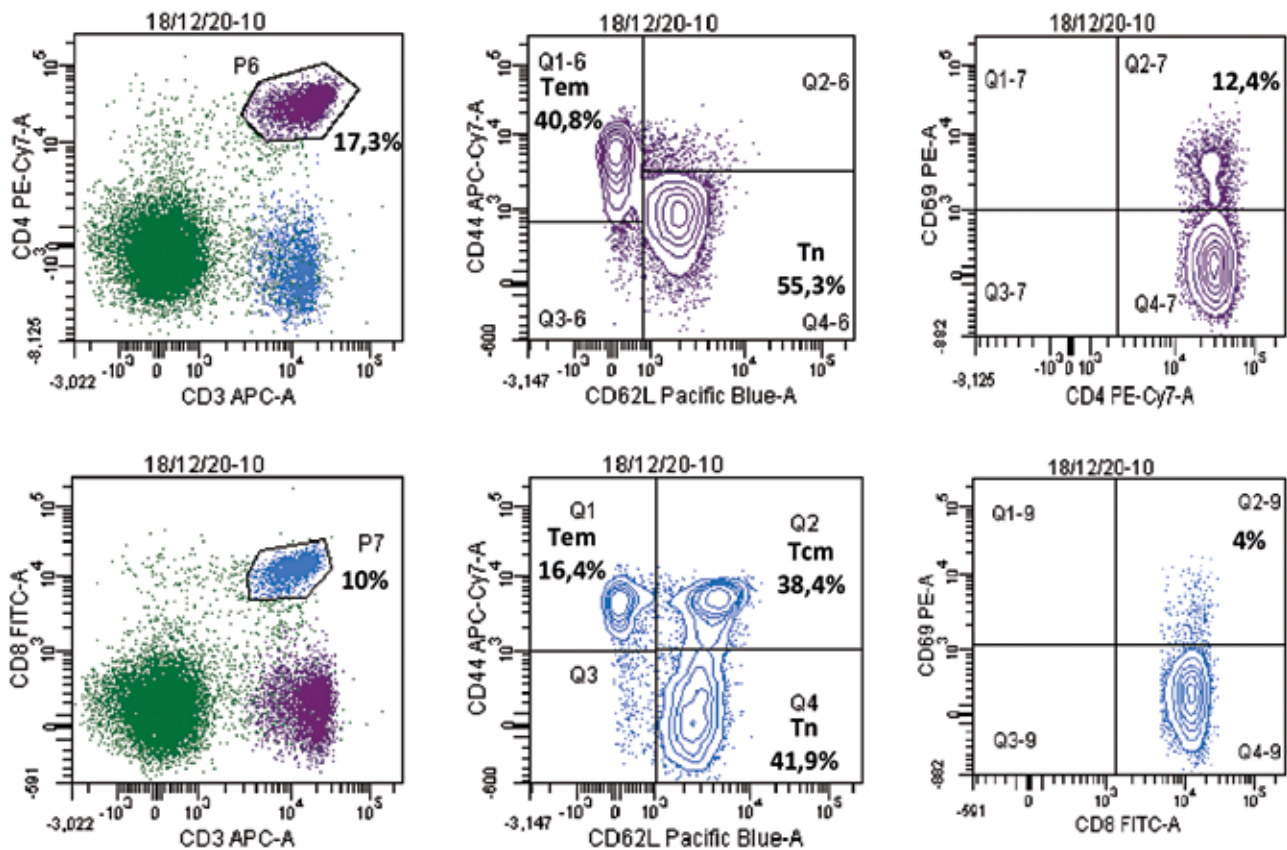
Fig. 1. Gating strategy of mouse spleen leukocytes, test tube 1. Of all the events, leukocytes can be distinguished by their FSC/SSC properties (gate P1). After the gating of leukocytes, doublets are excluded twice (P2 and P3), followed by the exclusion of dead cells (P4). Next, all CD45<sup>+</sup> cells (P5) are isolated and further measurements of T<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, NK-cells are carried out from this gate

в группе с опухолью мы видим значимое повышение количества CD19<sup>+</sup>-В-клеток по сравнению с контролем. По данным литературы, не было отмечено значимой разницы для CD19<sup>+</sup>-В-клеток в селезенке здоровых мышей и с меланомой B16 [11]. Возможно, это расхождение связано с отличиями в количестве перевиваемых опухолевых клеток. В работе [11] отмечено значимое снижение CD3<sup>+</sup>-клеток в селезенке мышей с опухолью. Нами также отмечено снижение количества CD3<sup>+</sup>-клеток в группе с опухолью по сравнению с контролем, но данное снижение не было статистически значимым. По данным литературы, количество NK-клеток в селезенке мышей после введения меланомы B16 меняется с течением времени. S. Paul и соавт. обнаружили увеличение субпопуляции NK-клеток в селезенке на 5-й день после введения

B16 по сравнению с селезенкой интактной мыши и возвращение к исходным уровням, как и в селезенке интактной мыши, на 13-й день [12]. Нами обнаружено статистически значимое снижение количества NK-клеток в селезенке мышей с выраженной опухолью. G. Isvoranu и соавт. также отметили существенное снижение количества NK-клеток в селезенке мышей с меланомой B16 [13].

При сравнении иммунофенотипа спленоцитов мышей контрольной группы и группы без опухоли, получавшей Poly(I:C) (3-я группа), показано отсутствие значимых различий для количества CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток и показателя CD4/CD8, при этом отмечается незначительное снижение иммунорегуляторного индекса после введения препарата (см. табл. 2). Нами отмечено статистически значимое





**Рис. 2.** Стратегия гейтирования лейкоцитов селезенки мыши, пробирка 2. Выделение  $CD45^+$ -клеток и исключение мертвых клеток с дублетами, как описано на рис. 1. Далее выделяются  $CD4^+$ -Т-клетки (P6) и среди них определяются  $CD69^+$ -клетки, а также Tn и Tem. Среди  $CD8^+$ -Т-клеток (P7) определяются  $CD69^+$ -клетки, а также Tn, Tcm, Tem

**Fig. 2.** Gating strategy of mouse spleen leukocytes, test tube 2. The isolation of  $CD45^+$  cells and the exclusion of dead cells with doublets is similar to Fig. 1. Next,  $CD4^+$  T cells (P6) are isolated and  $CD69^+$  cells, as well as Tn and Tem are determined among them.  $CD69^+$  cells, as well as Tn, Tcm, and Tem are identified among  $CD8^+$  T cells (P7)

повышение количества  $CD69$ -положительных  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -Т-клеток в 3-й группе по сравнению с контролем. Из литературы известно о способности Poly(I:C) индуцировать экспрессию  $CD69$  на поверхности  $CD4^+$ -Т-клеток [14]. Нами отмечено значимое повышение количества клеток  $CD4^+$ -Tem и  $CD8^+$ -Tcm в 3-й группе по сравнению с контролем. В литературе есть данные, что введение мышам Poly(I:C) через 12 ч приводит к снижению количества Т-клеток памяти в селезенке [15], но показано, что через сутки или более Poly(I:C) стимулирует пролиферацию  $CD44^+$   $CD8^+$ -Т-клеток памяти [16]. Также есть данные, что через несколько дней процент  $CD8^+$ -Т-клеток памяти в крови мышей начинает превышать значения нормы [17]. Нами не отмечено статистически значимых различий для параметров  $CD19$  и  $CD3$ . При этом отмечено значимое снижение количества НК-клеток после воздействия Poly(I:C) по сравнению с контролем. Можно отметить, что количество НК-клеток в 3-й группе (Poly(I:C)) оказалось ниже, чем во всех остальных группах.

На основании сравнения изменений иммунотипа между контрольной группой и 2-й или 3-й группами (для некоторых из них найдены подтверждения и обоснования в литературе) мы проанализировали результаты, полученные в 4-й группе, в которой мышам перевивали меланому и вводили Poly(I:C). Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что медианы таких параметров, как  $CD4/CD8$ , количество  $CD69$ -положительных Т-клеток  $CD4^+$  и  $CD8^+$ ,  $CD19$ , NKp46, для 4-й группы находятся между значениями медиан группы контроля и 2-й группы (B16-F10). Это может свидетельствовать о торможении роста опухоли под воздействием адьюванта Poly(I:C). В 4-й группе к окончанию эксперимента у 3 мышей не выросли опухоли, а у остальных имели объем не более  $0,5 \text{ см}^3$ , тогда как у мышей во 2-й группе опухоли достигали объема  $1 \text{ см}^3$  (рис. 3). Вероятно, опухоль меньших размеров оказывает более слабое влияние на иммунологические параметры.

Если сравнить показатели  $CD4/CD8$ , количество  $CD69$ -положительных Т-клеток  $CD4^+$  и  $CD8^+$ ,

Таблица 2. Субпопуляции исследуемых клеток, медиана (min–max), %

Table 2. Subpopulations of the investigated cells, median (min–max), %

| Антигены<br>Antigens       | 1-я группа (контроль)<br>Group 1 (control) | 2-я группа (B16-F10)<br>Group 2 (B16-F10) | 3-я группа (Poly(I:C))<br>Group 3 (Poly(I:C)) | 4-я группа (B16-F10 + Poly(I:C))<br>Group 4 (B16-F10 + Poly(I:C)) |
|----------------------------|--|---|---|---|
| CD4                        | 18,9<br>(17–21,8)                          | 14,9*<br>(11,8–18,8)                      | 16,8<br>(11,8–19,2)                           | 19,7**, ***<br>(17,1–21,1)  |
| CD8                        | 10,1<br>(8,7–11,4)                         | 9,2<br>(8,1–11,6)                         | 9,3<br>(9–12)                                 | 12,25*, **, ***<br>(9,8–13,2)                                     |
| CD4/CD8                    | 1,89<br>(1,73–2,11)                        | 1,51<br>(1,28–2,04)                       | 1,78<br>(0,98–2,06)                           | 1,67*<br>(1,43–1,84)  |
| CD69 на CD4<br>CD69 on CD4 | 12,1<br>(10,7–14,9)                        | 16,2*<br>(14,2–23,2)                      | 17,3*<br>(15–19,9)                            | 13,9**, ***<br>(10,5–15,7)  |
| CD69 на CD8<br>CD69 on CD8 | 4,5<br>(4–5,3)                             | 6,2*<br>(5,3–7,5)                         | 6,6*<br>(5,6–11,5)                            | 5,15***<br>(4,3–6,8)  |
| Tn от CD4<br>Tn from CD4   | 55<br>(50,9–55,8)                          | 49,3*<br>(38,3–54,1)                      | 51,8<br>(46,4–53,6)                           | 61,35*, **, ***<br>(57,5–65,4)                                    |
| Tem от CD4<br>Tem from CD4 | 34,9<br>(34,2–38,8)                        | 37,6<br>(35,9–51,5)                       | 39,6*<br>(38–43,9)                            | 28,6*, **, ***<br>(25,7–32,7)                                     |
| Tn от CD8<br>Tn from CD8   | 41,55<br>(36,5–43,5)                       | 35*<br>(27,8–40)                          | 39,6<br>(33,8–42,6)                           | 44,05*, **, ***<br>(42,2–53,4)                                    |
| Tem от CD8<br>Tem from CD8 | 16,45<br>(14,6–22)                         | 20,7<br>(13,1–25,1)                       | 16<br>(15–18,5)                               | 10,85*, **, ***<br>(9,2–14,2)                                     |
| Tcm от CD8<br>Tcm from CD8 | 38,1<br>(35,1–40,2)                        | 41,5<br>(35–47,5)                         | 40,3*<br>(37,9–48,2)                          | 39,7<br>(33,3–41,8)   |
| CD19                       | 51,5<br>(49,5–53,9)                        | 55,7*<br>(54,7–57,7)                      | 54,4<br>(49,4–56,5)                           | 52,3**<br>(44,3–56,1)   |
| CD3                        | 32,75<br>(29,9–38,3)                       | 30<br>(26,6–32,7)                         | 30,2<br>(28,4–34,2)                           | 36,2**, ***<br>(31,2–38,8)  |
| NK (NKp46)                 | 3,35<br>(2,9–4,4)                          | 2,8*<br>(2,8–3,2)                         | 2,7*<br>(2,2–2,9)                             | 2,95*<br>(1,9–3,2)  |

\*Различия показателей по сравнению с 1-й группой (контроль) статистически значимы ( $p < 0,05$ ); \*\*различия показателей по сравнению со 2-й группой (B16-F10) статистически значимы ( $p < 0,05$ ); \*\*\*различия показателей по сравнению с 3-й группой (Poly(I:C)) статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

\*Differences in indicators compared to the group 1 (control) are statistically significant ( $p < 0.05$ ); \*\*differences in indicators compared to the group 2 (B16-F10) are statistically significant ( $p < 0.05$ ); \*\*\*differences in indicators compared to the group 3 (Poly(I:C)) are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

процент Tn от CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, то можно отметить, что в 3-й группе (Poly(I:C)) они выше, чем во 2-й группе (B16-F10). В связи с этим можно предположить, что Poly(I:C) оказывал более сильное влияние на активационный маркер CD69 по сравнению с воздействием, оказываемым опухолью. Но при этом не было такой антигенной стимуляции, как в случае опухоли, и процент Tn остался более высоким, чем в группе с опухолью.

Для 4-й группы (B16 + Poly(I:C)) вычисленное значение иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 находится между более высоким значением – в 3-й группе (Poly(I:C)) и более низким значением – во 2-й группе (B16-F10) (см. табл. 2). Это может свидетельствовать о том, что меньший размер опухоли вызывает более слабую антигенную нагрузку и иммунорегуляторный индекс не понижается до значений 2-й группы за счет

влияния Poly(I:C). В 4-й группе количество CD19<sup>+</sup>-В-клеток и CD69-положительных Т-клеток ниже, чем в 3-й группе и во 2-й группе, но выше, чем в контрольной группе. То есть данные значения ближе к нормальному, чем в группе с опухолью и в группе с Poly(I:C). Количество NK-клеток в 4-й группе также оказалось ближе к контролю, чем в группе с опухолью и в группе с Poly(I:C). Такое приближение указанных выше параметров в 4-й группе к значениям в контрольной группе можно попытаться объяснить тем, что иммуноактивирующее влияние Poly(I:C) ослабевает под воздействием опухоли, за счет чего, например, становится меньше CD69-положительных Т-клеток. Но так как опухольевая нагрузка слабее, то и показатели становятся ближе к нормальным. В то же время нами обнаружено, что в 4-й группе общее количество CD3<sup>+</sup>-клеток и ко-

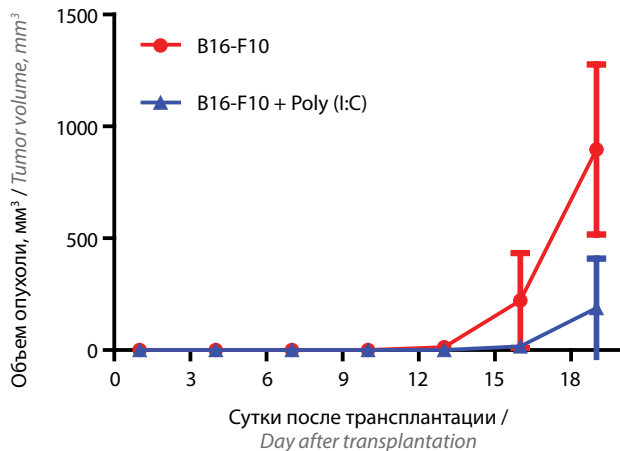


Рис. 3. Рост меланомы у мышей во 2-й группе (B16-F10 без препарата) и 4-й группе (B16-F10 с Poly (I:C))

Fig. 3. Melanoma growth in mice in group 2 (B16-F10 without the drug) and group 4 (B16-F10 with Poly (I:C))

личество Tn CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> оказалось выше, чем в остальных группах. Этот результат является достаточно необычным. Можно предположить, что повышение количества Tn под действием Poly(I:C) может дать преимущество в борьбе иммунитета против Т-зависимых опухолей, иммунный надзор за которыми в большей степени осуществляется Т-клетками. Меланома B16, как известно, является NK-зависимой опухолью [1]. Например, имеются данные, что Poly(I:C) способствовал усилению местного Т-клеточного ответа на мышинной модели опухоли 4T1-Luc [18].

### Заключение

При изучении влияния опухолевой нагрузки клетками меланомы B16-F10, а также 6-кратного введения адъюванта Poly(I:C) в сочетании с опухолевой нагрузкой и без нее на иммунофенотип спленоцитов мышей выявлен ряд отличий, которые оказались статистически значимы, и часть из которых также подтверждается данными литературы. В группе мышей с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), обнаружен ряд параметров, медиана которых оказалась в промежутке между значениями для групп контроля и B16-F10, не получавшей Poly(I:C). Можно предположить, что опухоль меньших размеров оказывает более слабое влияние на эти иммунологические параметры. В группе мышей с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), кроме того, обнаружен ряд параметров, медиана которых оказалась ближе к контролю, чем к значениям во 2-й группе (B16-F10) и в группе здоровых мышей, получавших Poly(I:C). Вероятно, иммуноактивирующее влияние Poly(I:C) ослабевает под воздействием опухоли, но так как опухолевая нагрузка меньше в 4-й группе, то и показатели становятся ближе к нормальным. Обнаружен необычный результат – общее количество CD3<sup>+</sup>-клеток и количество наивных Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> в группе с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), выше по сравнению с остальными тремя группами, что может дать преимущество в борьбе иммунитета против Т-зависимых опухолей.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Akazawa T., Ebihara T., Okuno M. et al. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(1):252–7. DOI: 10.1073/pnas.0605978104.
- Shime H., Kojima A., Maruyama A. et al. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic: polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J Innate Immun* 2014;6(3):293–305. DOI: 10.1159/000355126.
- Барышникова М.А., Рудакова А.А., Соколова З.С. и др. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(4):76–81. [Baryshnikova M.A., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of the antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(4):76–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81.
- Seliger B., Wollscheid U., Momburg F. et al. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61(3):1095–9. PMID: 11221838.
- Myrick C., DiGuisto R., DeWolfe J. et al. Linkage analysis of variations in CD4:CD8 T cell subsets between C57BL/6 and DBA/2. *Genes Immun* 2002;3(3):144–50. DOI: 10.1038/sj.gene.6363819.
- Cossarizza A., Chang H-D., Radbruch A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 2019;49(10):1457–1973. DOI: 10.1002/eji.201970107.
- Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol* 2017; 47(6): 946–53. DOI: 10.1002/eji.201646837.
- Esplugues E., Sancho D., Vèga-Ramos J. et al. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J Exp Med* 2003;197(9):1093–106. DOI: 10.1084/jem.20021337.
- Han Y., Guo Q., Zhang M. et al. CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009;182(1):111–20. DOI: 10.4049/jimmunol.182.1.111.
- Walzer T., Blery M., Chaix J. et al. Identification, activation, and selective *in vivo* ablation of mouse NK cells via

- NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(9):3384–9. DOI: 10.1073/pnas.0609692104.
11. Kamran N., Li Y., Sierra M. et al. Melanoma induced immunosuppression is mediated by hematopoietic dysregulation. *Oncoimmunology* 2017;7(3):e1408750. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1408750.
  12. Paul S., Kulkarni N., Shilpi, Lal G. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. *Oncoimmunology* 2016;5(12):e1235106. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1235106.
  13. Isvoranu G., Surcel M., Huica R. et al. Natural killer cell monitoring in cutaneous melanoma – new dynamic biomarker. *Oncol Lett* 2019;17(5):4197–206. DOI: 10.3892/ol.2019.10069.
  14. Radulovic K., Manta C., Rossini V. et al. CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. *J Immunol* 2012;188(4):2001–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1100765.
  15. Bahl K., Huebner A., Davis R., Welsh R. Analysis of apoptosis of memory T cells and dendritic cells during the early stages of viral infection or exposure to toll-like receptor agonists. *J Virol* 2010;84(10):4866–77. DOI: 10.1128/JVI.02571-09.
  16. Tough D., Borrow P., Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon *in vivo*. *Science* 1996;272(5270):1947–50. DOI: 10.1126/science.272.5270.1947.
  17. Koschella M., Voehringer D., Pircher H. CD40 ligation *in vivo* induces bystander proliferation of memory phenotype CD8 T cells. *J Immunol* 2004;172(8):4804–11. DOI: 10.4049/jimmunol.172.8.4804.
  18. Forghani P., Waller E. Poly(I:C) modulates the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015;153(1):21–30. DOI: 10.1007/s10549-015-3508-y.

#### Вклад авторов

A.B. Пономарев, М.А. Барышникова: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи, редактирование рукописи;

A.A. Рудакова: предоставление материалов исследования, сбор и обработка данных, редактирование рукописи;

Z.A. Соколова: предоставление материалов исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

B.C. Косоруков: концепция и дизайн, редактирование рукописи.

#### Author's contributions:

A.V. Ponomarev, M.A. Baryshnikova: concept and design, data analysis and interpretation, article writing the text of the manuscript, editing of the article;

A.A. Rudakova: provision of study materials, data collection and processing, editing of the article;

Z.A. Sokolova: provision of study materials, data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article;

V.S. Kosorukov: concept and design, editing of the article.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

A.B. Пономарев / A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>

A.A. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

Z.A. Соколова / Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

M.A. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

B.C. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

#### Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения России в рамках исследования № АААА-А20-120022090056-5.

**Financing.** The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No AAA-A-20-120022090056-5.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

**Statement of the welfare of animals.** The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 05.08.2021. Принята к публикации: 01.10.2021.

Article received: 05.08.2021. Accepted for publication: 01.10.2021.